

# Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/EP04/013582

International filing date: 30 November 2004 (30.11.2004)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: IT  
Number: MI2003A002391  
Filing date: 05 December 2003 (05.12.2003)

Date of receipt at the International Bureau: 17 March 2005 (17.03.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland  
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

884 PCT



# Ministero delle Attività Produttive

*Direzione Generale per lo Sviluppo Produttivo e la Competitività*

*Ufficio Italiano Brevetti e Marchi*

*Ufficio G2*



**Autenticazione di copia di documenti relativi alla domanda di brevetto per:  
INVENZIONE INDUSTRIALE N. MI/2003/A /002391 del 05.12.2003**

Si dichiara che l'unità copia è conforme ai documenti originali  
depositati con la domanda di brevetto sopra specificata, i cui dati  
risultano dall'accluso processo verbale di deposito.

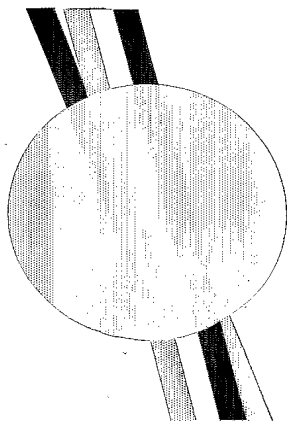
EP/04/13582

Roma, li.....21 DIC 2004

IL FUNZIONARIO

Giampietro Carlotta

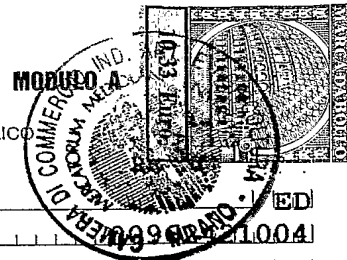
*Giampietro Carlotta*



# AL MINISTERO DELLE ATTIVITÀ PRODUTTIVE

UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI - ROMA

DOMANDA DI BREVETTO PER INVENZIONE INDUSTRIALE, DEPOSITO RISERVE, ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO



## A. RICHIEDENTE (I)

1) Denominazione **CONSIGLIO NAZIONALE DELLE RICERCHE** codice **11.004**  
 Residenza **Roma**  
 2) Denominazione  codice   
 Residenza

## B. RAPPRESENTANTE DEL RICHIEDENTE PRESSO L'U.I.B.M.

cognome nome **Bianchetti Giuseppe ed altri** cod. fiscale   
 denominazione studio di appartenenza **Bianchetti Bracco Minoja s.r.l.**  
 via **Rossini** n. **8** città **Milano** cap **20122** (prov) **MI**

## C. DOMICILIO ELETTIVO destinatario

via  n.  città  cap  (prov)

## D. TITOLO

classe proposta (sez/cl/sci)  gruppo/sottogruppo

**"Olive da mensa contenenti microrganismi probiotici"**

## ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO:

SI ☐ NO ☒

SE ISTANZA: DATA  /  /

N° PROTOCOLLO

## E. INVENTORI DESIGNATI

cognome nome

cognome nome

1) **Lavermicocca Paola** 3) **Visconti Angelo**  
 2) **Lonigro Stella Lisa** 4) **De Angelis Maria**

## F. PRIORITÀ

nazione o organizzazione

tipo di priorità

numero di domanda

data di deposito

allegato  
S/R

1)     /  /   
 2)     /  /

## SCIoglimento RISERVE

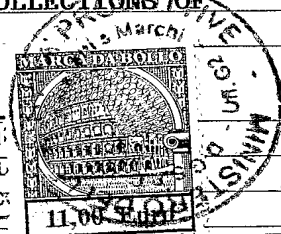
Data N° Protocollo

/  /   /  /

G. CENTRO ABILITATO DI RACCOLTA CULTURE DI MICRORGANISMI, denominazione **BELGIAN COORDINATED COLLECTIONS FOR MICROORGANISMS - BCCM/LMG COLLECTION (BELGIO)**

## H. ANNOTAZIONI SPECIALI

Il rappresentante pur informato del contenuto della circolare n. 423 del 01/03/2001 effettua il deposito con riserva di lettera di incarico.



## DOCUMENTAZIONE ALLEGATA

N. es.

Doc. 1) **1** **PROV** n. pag. **18** riassunto con disegno principale, descrizione e rivendicazioni (obbligatorio 1 esemplare) ....  
 Doc. 2) **1** **PROV** n. tav. **04** disegno (obbligatorio se citato in descrizione, 1 esemplare) .....  
 Doc. 3) **0** **XRIS** lettera d'incarico, procura o riferimento procura generale .....  
 Doc. 4) **0** **RIS** designazione inventore .....  
 Doc. 5) **0** **RIS** documenti di priorità con traduzione in italiano .....  
 Doc. 6) **0** **RIS** autorizzazione o atto di cessione .....  
 Doc. 7) **0** nominativo completo del richiedente

## SCIoglimento RISERVE

Data N° Protocollo

/  /   /  /

confronta singole priorità

/  /   /  /

8) attestati di versamento, totale Euro

**Duecentonovantuno/80#**

obbligatorio

COMPILATO IL **05/12/2003**

FIRMA DEL(I) RICHIEDENTE(I)

**Bianchetti Giuseppe**

CONTINUA SI/NO

**SI**

DEL PRESENTE ATTO SI RICHIEDE COPIA AUTENTICA SI/NO

**SI**

CAMERA DI COMMERCIO IND. ART. E AGR. DI **MILANO MILANO**

codice **15**

VERBALE DI DEPOSITO

NUMERO DI DOMANDA

**MI2003A 002391**

Reg. A.

L'anno

**DUEMILATRE**

**DICEMBRE**

il(i) richiedente(i) sopraindicato(i) ha(hanno) presentato a me sottoscritto la presente domanda **01** fogli aggiuntivi per la concessione del brevetto sopraindicato.

I. ANNOTAZIONI VARIE DELL'UFFICIALE ROGANTE

IL DEPOSITANTE

**Daniela Jada**

dell'Ufficio

L'UFFICIALE ROGANTE

**M. CORTONESI**



**M. CORTONESI**

## A. RICHIEDENTE (I)

			N.G.
<input type="checkbox"/>	Denominazione		<input type="checkbox"/>
	Residenza		<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	Denominazione		<input type="checkbox"/>
	Residenza		<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	Denominazione		<input type="checkbox"/>
	Residenza		<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	Denominazione		<input type="checkbox"/>
	Residenza		<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	Denominazione		<input type="checkbox"/>
	Residenza		<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	Denominazione		<input type="checkbox"/>
	Residenza		<input type="checkbox"/>

## E. INVENTORI DESIGNATI

	cognome nome	cognome nome
05	Valerio Francesca	
06	Morelli Lorenzo	

## F. PRIORITÀ

nazione o organizzazione	tipo di priorità	numero di domanda	data di deposito	allegato S/R	SCIoglimento RISERVE
					Data N° Protocollo

FIRMA DEL(I) RICHIEDENTE(I)

Bianchetti Giuseppe

G. Bianchetti

RIASSUNTO INVENZIONE CON DISEGNO PRINCIPALE, DESCRIZIONE E RIVENDICAZIONE

NUMERO DOMANDA

M/2003 A 002394 REG. A

DATA DI DEPOSITO

05/12/2003

NUMERO BREVETTO

DATA DI RILASCIO

[ ]/[ ]/[ ]

## D. TITOLO

"Olive da mensa contenenti microrganismi probiotici"

## L. RIASSUNTO

L'invenzione riguarda olive da mensa arricchite con microrganismi probiotici, in particolare lattobacilli e bifidobatteri, alimenti che le contengono ed un metodo per la loro preparazione. Le olive e gli alimenti probiotici dell'invenzione apportano una quantità di microrganismi sufficiente ad esercitare un'azione benefica per il tratto gastro-intestinale e sono particolarmente vantaggiosi in tutte le situazioni in cui non è possibile la somministrazione di alimenti probiotici di origine animale, in particolare di derivati del latte.

## M. DISEGNO



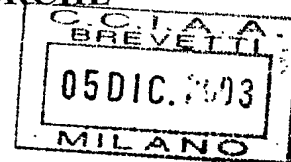
7147 M Descrizione del brevetto per invenzione industriale avente per titolo:

MV/mgg **"OLIVE DA MENSA CONTENENTI MICRORGANISMI  
PROBIOTICI"**

a nome : **CONSIGLIO NAZIONALE DELLE RICERCHE**

con sede in : Roma

\* \* \*



### **CAMPO DELL'INVENZIONE**

**MI 2003 A 0 0 2 3 9 1**

La presente invenzione riguarda alimenti probiotici, ossia alimenti contenenti microrganismi ad effetto benefico per la salute, in particolare nei confronti del tratto gastrointestinale.

### **SFONDO DELL'INVENZIONE**

Gli alimenti funzionali probiotici sono generalmente alimenti fermentati che contengono un numero sufficientemente elevato di microrganismi vivi ed attivi in grado di raggiungere l'intestino e di esercitare un'azione di equilibrio sulla microflora intestinale. L'assunzione di probiotici stimola la crescita dei microrganismi vantaggiosi, riduce il numero dei patogeni e rinforza le difese naturali dell'organismo. È infatti riconosciuto il contributo dei batteri probiotici, in particolare lattobacilli e bifidobatteri, al mantenimento dell'equilibrio della flora intestinale (Salminen S., et al. Int. Dairy J. 8:563-572, 1998; Saarela M., L. et al., Int. J. Food Microbiol. 2002, 78:99-117), nonché la loro capacità di inibire i patogeni (Drago L., M. R. et al., FEMS Microbiol. Letters, 1997, 153:455-463 e Cross M. L. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 2002, 34:245-253) e quindi di proteggere l'organismo da disturbi gastro-intestinali. Infatti, in condizioni in cui la microflora intestinale è alterata, la somministrazione di batteri probiotici

garantisce non solo il ristabilirsi del normale equilibrio, ma migliora anche il bilancio microbico e le proprietà della microflora endogena. Inoltre, è in fase di studio il ruolo dei probiotici nella prevenzione di allergie e intolleranze alimentari (Isolauro E., et al., Am. J. Clin. Nutr. 2001, 73 (suppl.): 444s-450s; Jahreis G., et al. Food Res. Int. 2002, 35:133-138).

Nei prodotti destinati all'alimentazione umana, i batteri probiotici sono incorporati soprattutto nel latte fermentato, ad esempio nello yogurt. Uno dei problemi associati alla produzione degli alimenti probiotici è costituito dall'influenza delle tecnologie di produzione sulle proprietà dei ceppi, in particolare sulla vitalità e integrità cellulare, nonché sulla dimensione e sulla stabilità della popolazione (Mattila-Sandholm T., et al. Int. Dairy, 2002 J. 12: 173-182). In passato sono state largamente utilizzate colture liquide e congelate, i cui costi di produzione, trasporto e conservazione sono tuttavia elevati. Attualmente molto diffuse sono le colture liofilizzate, ma spesso le cellule vengono danneggiate e non possono essere conservate a lungo. Infatti, le cellule liofilizzate sopravvivono in uno stato di anabiosi e la loro vitalità viene ripristinata mediante reidratazione. Non solo questo processo non garantisce la sopravvivenza di tutte le cellule, ma quelle che sopravvivono possono anche non essere metabolicamente efficienti e non sopportare l'elevata acidità dello stomaco. Molto comuni sono inoltre le colture concentrate di cellule in vasetti monodose, in commercio fresche o congelate. La maggiore difficoltà in questo caso è rappresentata dalla propagazione dei batteri, necessaria per ottenere concentrazioni elevate, pari a circa  $10^{10}$  unità formanti colonia (UFC)/g. Pertanto, la maggior parte dei prodotti probiotici è costituita attualmente da prodotti di origine animale, in particolare lattiero-

caseari come yogurt, formaggi, dessert, gelati. Tuttavia, la possibilità di consumo di questi prodotti risulta limitata a causa di allergie e intolleranze al latte, e derivati. È nota inoltre la difficoltà di introdurre bifidobatteri, microrganismi molto utilizzati negli alimenti probiotici, nei fermentati del latte, a causa della sensibilità ceppo-correlata ai batteri che avviano la fermentazione, al pH, alla temperatura e alla concentrazione di ossigeno (Gobbetti M. et al. J. Dairy Sci. 1998, 81:37-47).

A livello sperimentale è stata ottenuta frutta disidratata impregnata sotto vuoto con microrganismi probiotici (Betoret N., et al. J. Food Engin. 2003, 56: 273-277), mentre alcuni prodotti a base di avena e succhi di frutta contenenti ceppi probiotici (Johansson et al. Int. J. Food Microbiol., 1998, 42:29-38) sono già presenti sul mercato.

È inoltre importante notare che tutti i prodotti sopra elencati richiedono di essere consumati rapidamente una volta aperti.

Sarebbe pertanto vantaggioso disporre di un alimento che consenta di somministrare batteri probiotici senza indurre fenomeni di allergia o intolleranza e che possa essere conservato a lungo dopo l'apertura.

#### **DESCRIZIONE DETTAGLIATA DELL'INVENZIONE**

La presente invenzione riguarda alimenti probiotici a base di olive da mensa contenenti batteri probiotici.

In un primo aspetto dell'invenzione, l'alimento è costituito da olive da mensa sul cui pericarpo sono adesi microrganismi appartenenti ai generi *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, in particolare lattobacilli e bifidobatteri probiotici. Preferibilmente, i lattobacilli sono scelti fra *Lactobacillus rhamnosus* e *Lactobacillus paracasei*, mentre i bifidobatteri sono scelti fra

*Bifidobacterium bifidum* e *Bifidobacterium longum*. Ancor più preferibilmente, i microrganismi sono scelti fra: *Lactobacillus rhamnosus* GG ATCC53103; *L. rhamnosus* IMPC 11; *L. rhamnosus* IMPC 19; *Lactobacillus paracasei* IMPC 2.1 (depositato alla Belgian Coordinated Collections of Microorganisms, BCCM/LMG-Collection, Gent, Belgio, numero di accesso LMG P-22043); *Lactobacillus paracasei* IMPC 4.1; *Bifidobacterium bifidum* ATCC15696 e *Bifidobacterium longum* ATCC15708.

Le olive dell'invenzione possono essere preparate mantenendo, a temperatura ambiente (mediamente 25°C), olive da mensa in una sospensione del microrganismo desiderato. Si ottengono in questo modo olive sul cui pericarpo sono presenti microrganismi in numero compreso fra  $5 \times 10^5$  e  $5 \times 10^8$  UFC per grammo (valutazione a 3 mesi di conservazione, si vedano tabelle 1 e 2).

Le olive da mensa della presente invenzione possono essere convenientemente consumate tal quali, oppure essere utilizzate per la preparazione di alimenti probiotici, che sono un ulteriore aspetto della presente invenzione.

Le olive e gli alimenti probiotici della presente invenzione costituiscono infatti un mezzo efficace per prevenire o trattare disordini intestinali o ristabilire la flora intestinale danneggiata dal trattamento con antibiotici.

Particolarmente vantaggiose sono olive arricchite con *L. paracasei* IMPC 2.1, non solo per le importanti caratteristiche probiotiche del microrganismo, per la sua capacità di svilupparsi sia in condizioni aerobie che anaerobie e per l'elevata capacità di adesione al pericarpo, ma anche per la resistenza ai succhi gastrici e ai sali biliari. *L. paracasei* IMPC 2.1 è un



microrganismo nuovo e costituisce un ulteriore oggetto dell'invenzione.

Di particolare importanza è anche la possibilità di incorporare bifidobatteri, in quanto è noto che questi microrganismi si riproducono e sopravvivono difficilmente in prodotti fermentati del latte.

Le olive della presente invenzione e gli alimenti che le contengono sono particolarmente adatti nella profilassi e nel trattamento di malattie causate da contaminanti alimentari, nelle patologie gastro-intestinali che colpiscono i viaggiatori, come coadiuvanti nei trattamenti con antibiotici e, più in generale, nelle situazioni in cui è necessario incrementare le difese immunitarie dell'organismo.

La facilità di assunzione, la conservabilità anche in condizioni non refrigerate (dopo 90 giorni di conservazione a temperatura ambiente) la conta batterica è compresa fra  $1 \times 10^5$  e  $7.6 \times 10^7$  UFC per grammo), nonché le caratteristiche organolettiche del prodotto, fanno sì che le olive possano essere somministrate in situazioni in cui è richiesta l'assunzione rapida di batteri probiotici e anche da parte di soggetti intolleranti al lattosio. Un ulteriore vantaggio è costituito dal fatto che l'assunzione di solo una parte del contenuto della confezione (le olive e non la salamoia), apporta una dose di batteri probiotici corrispondente a quella contenuta per esempio in prodotti come yogurt o colture concentrate.

Infine è da notare che, rispetto ad alimenti probiotici di origine animale o vegetale nei quali i microrganismi sono risospesi in una matrice liquida, sulle olive le cellule batteriche vengono immobilizzate, cosa che ne garantisce un efficace e sicuro trasporto nel tratto gastro-intestinale. Inoltre, il legame ad un prodotto con una elevata componente grassa come l'oliva consente che i

microrganismi sopravvivano all'attacco dei succhi gastrici.

## PARTE SPERIMENTALE

### Esempio 1 - Vitalità di batteri probiotici sul pericarpo delle olive

È stata valutata la capacità di colonizzazione del pericarpo delle olive da mensa e la persistenza nel tempo dei seguenti ceppi: *Lactobacillus rhamnosus* GG ATCC53103, *L. rhamnosus* IMPC11 e IMPC19, *Lactobacillus paracasei* IMPC 2.1 e IMPC 4.1, *Bifidobacterium bifidum* ATCC15696 e *Bifidobacterium longum* ATCC15708.

Il ceppo IMPC 2.1 di *Lactobacillus paracasei* è stato depositato alla Belgian Coordinated Collections of Microorganisms, BCCM/LMG-Collection, Gent, Belgio ed ha ricevuto il numero di accesso LMG P-22043.

Le prove sono state effettuate su campioni di olive nere denocciolate e intere, precedentemente rese eduli mediante un processo di deamarizzazione e trasformazione. Le stesse prove sono state effettuate anche con olive verdi e nere non trasformate e con quelle verdi deamarizzate e trasformate. La vitalità dei ceppi è stata valutata utilizzando giare contenenti 80 olive/280 ml della propria salamoia - NaCl 4%, pH 6,5.

*Procedura.* Le olive sono immerse nella salamoia alla quale viene aggiunta una sospensione batterica contenente da  $4 \times 10^9$  a  $9 \times 10^{11}$  unità formanti colonie totali (UFC) per ciascun batterio. Dopo l'inoculo le olive sono poste in barattoli sterili chiusi con tappo a vite. Come controllo sono state utilizzate olive non inoculate, anch'esse poste in barattoli. I campioni sono stati conservati per 3 mesi a temperatura ambiente (mediamente 25°C) e 4 olive per ciascun campione sono state prelevate a  $t=1, 15, 30$  e 90 giorni e sottoposte a conta batterica. Ad ogni prelievo le olive sono state

completamente sgocciolate del loro liquido di governo, addizionate di 20 ml di NaCl (0,85%) e Tween 80 (0,025%) e vigorosamente agitate per due ore per permettere il distacco dei batteri dal pericarpo. La sospensione risultante è stata seminata su substrato agarizzato per la conta dei batteri lattici. I risultati sono riportati nelle seguenti tabelle.

**Tabella 1. UFC per grammo di prodotto (olive denocciate)**

ceppo	1 giorno	15 gg	30 gg	90 gg
<i>L. rhamnosus</i> GG ATCC53103	$5,0 \times 10^8$	$3,5 \times 10^7$	$3,4 \times 10^7$	$3,2 \times 10^7$
<i>L. rhamnosus</i> IMPC 11	$7,0 \times 10^7$	$8,0 \times 10^8$	$7,5 \times 10^7$	$7,6 \times 10^7$
<i>L. rhamnosus</i> IMPC19	$7,2 \times 10^7$	$8,5 \times 10^8$	$6,8 \times 10^6$	$6,9 \times 10^6$
<i>L. paracasei</i> IMPC 2.1	$7,6 \times 10^7$	$2,0 \times 10^9$	$7,9 \times 10^7$	$6,0 \times 10^6$
<i>L. paracasei</i> IMPC 4.1	$4,8 \times 10^7$	$5,8 \times 10^7$	$6,5 \times 10^7$	$6,8 \times 10^7$
<i>B. bifidum</i> ATCC 15696	$2,5 \times 10^7$	$8,0 \times 10^7$	$5,2 \times 10^7$	$4,3 \times 10^6$
<i>B. longum</i> ATCC 15708	$4,5 \times 10^6$	$2,7 \times 10^7$	$8,7 \times 10^6$	$5,2 \times 10^5$

**Tabella 2. UFC per grammo di prodotto (olive intere)**

ceppo	1 giorno	15 gg	30 gg	90 gg
<i>L. rhamnosus</i> GG ATCC53103	$1,8 \times 10^7$	$2,3 \times 10^6$	$7,6 \times 10^5$	$3,9 \times 10^6$
<i>L. rhamnosus</i> IMPC 11	$7,0 \times 10^6$	$1,0 \times 10^7$	$2,4 \times 10^6$	$1,5 \times 10^6$
<i>L. rhamnosus</i> IMPC19	$3,5 \times 10^6$	$1,0 \times 10^7$	$2,5 \times 10^5$	$2,7 \times 10^5$
<i>L. paracasei</i> IMPC 2.1	$7,4 \times 10^6$	$3,0 \times 10^7$	$4,4 \times 10^7$	$9,0 \times 10^6$
<i>L. paracasei</i> IMPC 4.1	$7,1 \times 10^6$	$1,1 \times 10^7$	$5,4 \times 10^7$	$8,0 \times 10^6$
<i>B. bifidum</i> ATCC 15696	$1,3 \times 10^6$	$7 \times 10^6$	$3,6 \times 10^6$	$1,2 \times 10^6$
<i>B. longum</i> ATCC 15708	$5,0 \times 10^5$	$3,6 \times 10^6$	$3,6 \times 10^6$	$1,0 \times 10^5$

Tutte le prove sono state ripetute due volte e non sono state osservate variazioni rilevanti.

Il pericarpo delle olive consente un forte ancoraggio delle cellule

batteriche e ne assicura il rilascio a seguito dell'assunzione. Questa caratteristica è dimostrata dalla drastica procedura di risospensione dei batteri. In particolare, in campioni osservati a 30 gg dall'aggiunta dei batteri, dopo 2 ore di agitazione vigorosa in soluzione fisiologica addizionata di Tween sono state recuperate mediamente  $10^6$  UFC/g; dopo 3 successivi lavaggi (1 ora ciascuno nelle stesse condizioni), circa  $10^5$ ,  $10^4$  e  $10^4$  UFC/g, sono state ancora trovate adese al pericarpo. Analoga tenacità è stata osservata in campioni prelevati dopo 7 o 90 giorni dall'aggiunta dei batteri.

### **Esempio 2 - Selezione del ceppo di riferimento *Lactobacillus paracasei* IMPC 2.1**

*Lactobacillus paracasei* IMPC 2.1 è stato isolato da soggetto umano adulto sano con dimensioni della popolazione di  $10^7$  UFC/g di feci.

#### **Identificazione genetica del ceppo**

Il primo passaggio di identificazione è stato quello di eseguire una PCR specie specifica utilizzando i primer Y2/PARA (Figura 1). Y2 è il primer universale utilizzato per gli eubatteri, mentre PARA è il primer specifico per i batteri appartenenti al genere *L. paracasei*.

Da questa analisi è emerso che il ceppo IMPC 2.1 presenta una banda di amplificazione in corrispondenza di un peso pari a 290 bp, tipica della specie *L. paracasei*.

È stata poi effettuata una seconda analisi di conferma dell'identificazione a livello di specie. La tecnica utilizzata è stata l'ARDRA, utilizzando come enzima di restrizione Sau 3AI; anche in questo caso si sono ottenuti i profili di restrizione attesi per la specie *L. paracasei* (Figura 2)

Si è osservato che il ceppo *L. paracasei* IMPC 2.1 presenta elevata



capacità di adesione al muco intestinale di maiale, elevata resistenza ai sali biliari, elevata resistenza ai succhi gastrici, elevata capacità di adesione a superfici abiotiche ed elevata capacità di adesione al pericarpo, come dimostrato dai seguenti esperimenti.

**Adesione al muco intestinale di maiale come test in vitro per la predizione della capacità di adesione in vivo.**

Le prove di adesione al muco sono state svolte attraverso una parziale modifica di quanto proposto da Schou, et al. (APMIS 1999, 107: 493-504).

Una sospensione batterica titolata (100 µl, tampone: PBS) viene posta in piastre a 96 pozzetti, preventivamente rivestiti con muco di maiale (Tipo II, Sigma). Dopo 2 h di incubazione a 37°C in agitazione orbitante si procede a tre successivi lavaggi con PBS e alla semina in piastra dei lavaggi e, alla fine, del muco staccato meccanicamente dalle pareti del pozzetto. La figura 3 riporta l'immagine ripresa al SEM del ceppo IMPC *L. paracasei* 2.1 adeso al muco dopo i tre lavaggi di cui sopra.

I ceppi di *L. paracasei* utilizzati per questo test sono riportati di seguito. Le conte ottenute mediante semina in piastra hanno fornito i seguenti risultati, espressi come percentuale di UFC contate sul muco nel passaggio finale rispetto al numero di UFC utilizzate:

- 1) IMPC 2.1= 40%
- 2) IMPC CV1= 37%
- 3) IMPC 4.1= 10%
- 4) IMPC 1.3= 40%
- 5) IMPC 1.5= 33%
- 6) IMPC 1.4= 35%

7) Chr.Hansen Lc1= 39%

8) IMPC CLV1= 38%

9) ATCC 10863= 18%

Il ceppo IMPC 2.1 risulta quindi essere uno dei ceppi con migliore capacità di adesione al muco.

### Resistenza ai sali biliari

La resistenza di ceppi di *L. paracasei* è stata valutata utilizzando MRS (De Man et al., J. Appl. Bacteriol., 1960, 23:130-135) liquido contenente sali di bile bovina Oxgall a diverse concentrazioni. Le prime prove sono state condotte utilizzando 0,2, 0,3, 0,4% di Oxgall: in tali condizioni il ceppo mostra una crescita ridotta all'aumentare della concentrazione di Oxgall, ma comunque ancora abbastanza elevata. La crescita è stata valutata misurando la densità ottica (OD) a 600 nm.

CEPPO	MRS	0,2% Oxgall	0,3% Oxgall	0,4% Oxgall
2.1	1,847	1,678	1,739	1,570
Acti	1,942	1,587	1,314	1,043
Sal	1,942	1,674	1,583	1,451
CV1	1,853	1,640	1,518	1,312
CLV1	1,813	1,688	1,634	1,344
B21070	1,714	1,455	1,316	1,185
B21060	1,954	1,789	1,657	1,453
1.3	1,829	1,818	1,697	1,583
1.4	1,843	1,840	1,679	1,581
1.5	1,875	1,760	1,818	1,674
4.1	1,978	1,694	1,441	1,559

Nella fase successiva la concentrazione dei sali di bile è stata aumentata fino ad arrivare allo 0,7%.

CEPPO	MRS	0,5% Oxgall	0,6% Oxgall	0,7% Oxgall
<b>2.1</b>	<b>1,458</b>	<b>0,792</b>	<b>0,178</b>	<b>0,095</b>
Acti	1,548	0,139	0,061	-0,132
Sal	1,354	0,758	0,562	0,353
CV1	1,399	0,160	-0,038	-0,156
CLV1	1,313	0,322	0,176	0,055
B21070	1,435	-0,142	-0,200	-0,193
B21060	1,367	0,729	0,611	0,280
1.3	1,377	0,576	0,234	0,314
1.4	1,525	0,695	0,927	0,396
1.5	1,475	0,866	0,916	0,603
4.1	1,502	0,817	0,764	0,561

Il ceppo IMPC 2.1 risulta quindi essere uno dei ceppi con buona resistenza ai sali di bile.

### **Resistenza alla salinità**

Per valutare la resistenza dei ceppi a diverse concentrazioni di NaCl è stato utilizzato MRS liquido. Anche in questo caso l'entità della crescita è stata valutata mediante lettura spettrofotometrica della densità ottica a 600 nm.

CEPPO	MRS	0,5% NaCl	1% NaCl	2% NaCl
<b>2.1</b>	<b>1,847</b>	<b>1,644</b>	<b>1,457</b>	<b>1,513</b>
Acti	1,942	1,551	1,689	1,483
Sal	1,942	1,685	1,665	1,601
CV1	1,853	1,555	1,541	1,781
CLV1	1,813	1,512	1,689	1,648
B21070	1,714	1,711	1,658	1,491
B21060	1,954	1,560	1,717	1,510
1.3	1,829	1,656	1,631	1,697
1.4	1,843	1,658	1,795	1,737
1.5	1,875	1,534	1,554	1,697
4.1	1,978	1,811	1,762	1,596

Essendo la crescita molto elevata anche con concentrazioni di NaCl del 2%, sono state eseguite prove con concentrazioni più elevate.

CEPPO	MRS	3% NaCl	4% NaCl	5% NaCl
<b>2.1</b>	<b>1,300</b>	<b>1,217</b>	<b>1,081</b>	<b>0,896</b>
Acti	1,327	1,317	1,169	1,073
Sal	1,288	1,275	1,180	0,985
CV1	1,283	1,185	1,031	0,829
CLV1	1,217	1,158	1,036	0,799
B21070	1,266	1,269	1,128	0,947
B21060	1,321	1,177	1,090	0,962
1.3	1,239	1,207	1,050	0,922
1.4	1,306	1,183	1,026	0,823
1.5	1,289	1,266	1,061	0,899
4.1	1,291	1,245	1,075	0,897

Il ceppo IMPC 2.1 risulta quindi essere uno dei ceppi con migliore resistenza alla salinità

#### **Resistenza al succo gastrico simulato (UFC/ml):**

La resistenza dei ceppi al succo gastrico simulato è stata valutata utilizzando colture dei vari ceppi in MRS liquido. Le colture sono state lavate in soluzione salina sterile e aggiunte a pari volume di succo gastrico simulato ( $\text{NaCl}$ ,  $125\text{mM}^{-1}$ ;  $\text{KCl}$   $7\text{ mM}^{-1}$ ;  $\text{NaHCO}_3$ ,  $45\text{ mM}^{-1}$  e pepsina,  $3\text{ gr l}^{-1}$ ). Il pH finale è stato portato a 2 con  $\text{HCl}$ . Le sospensioni sono state quindi incubate a temperatura ambiente sotto agitazione ( $200\text{ riv min}^{-1}$ ) per simulare la peristalsi. Aliquote sono state prelevate al tempo 0 e a 90 e 150 minuti per la conta su MRS agar.



Ceppo	T <sub>0</sub>	T <sub>1</sub> (90 min)	T <sub>2</sub> (150 min)
2.1	44•10 <sup>6</sup>	1,22•10 <sup>8</sup>	2,15•10 <sup>7</sup>
1.4	41•10 <sup>6</sup>	4,5•10 <sup>7</sup>	3•10 <sup>7</sup>
B21070	17,8•10 <sup>6</sup>	2•10 <sup>7</sup>	5,8•10 <sup>7</sup>
Sal	197•10 <sup>6</sup>	1,13•10 <sup>8</sup>	5,2•10 <sup>7</sup>
4.1	116•10 <sup>6</sup>	1,09•10 <sup>8</sup>	1,77•10 <sup>7</sup>

Il ceppo IMPC 2.1 risulta quindi essere uno dei ceppi con migliore resistenza al succo gastrico simulato.

### **Adesione a superfici abiotiche**

La capacità di adesione del ceppo, caratteristica essenziale per la colonizzazione della mucosa intestinale è stata anche valutata in un saggio di adesione ad una superficie abiotica (Tuomola et al., Int. J. Food Microbiol., 2000, 41:45-51). Il ceppo è stato fatto crescere in substrato MRS, a 37°C per 48 ore in anaerobiosi. Le colture sono state quindi diluite 1:40 in MRS e aliquote di 200 µl sono state deposte in piastre di polistirene per colture cellulari a 96 pozzetti. Dopo 24 h di incubazione a 37°C i pozzetti sono stati delicatamente risciacquati 3 volte con tampone fosfato Dulbecco (DPBS, pH 7,3), lasciati asciugare e addizionati di una soluzione violetto cristallo per colorare le cellule batteriche. L'eccesso di colorante è stato allontanato con lavaggi con etanolo-acetone (80:20 v/v) e la densità ottica (DO) delle piastre è stata determinata usando un lettore automatico. Sulla base dei valori di DO sono state quindi individuate 4 classi di adesione (AC) delle cellule alla superficie delle piastre: no adesione (AC1, OD ≤0,5), debole adesione (AC2, 0,5 < OD ≤1,2), media adesione (AC3, 1,2 < OD ≤2,0) e forte adesione (AC4, OD > 2,0) (Tabella 3).

Al fine di studiare l'effetto di trattamenti enzimatici, fisici e chimici sulla capacità di adesione dei ceppi, colture batteriche prelevate all'inizio

della fase stazionaria (6 h di crescita) sono state sottoposte, alle appropriate condizioni di temperatura e tempi, ai vari trattamenti e quindi è stata valutata la modificazione della loro capacità di adesione. Le caratteristiche di adesione sono riportate nella seguente tabella. I risultati dimostrano che le caratteristiche di adesione del ceppo sono generalmente poco alterate da trattamenti fisici, chimici ed enzimatici.

**Tabella 3. Capacità di adesione del ceppo *L. paracasei* IMPC 2.1, in confronto a *L. rhamnosus* GG ATCC53103 e ad un altro ceppo di *L. paracasei*, su superficie abiotica e sua modificazione dovuta a trattamenti fisici, chimici ed enzimatici.**

Trattamento	Ceppo	<i>L. rhamnosus</i> GG ATCC53103	<i>L. paracasei</i> IMPC 2.1	<i>L. paracasei</i> IMPC 4.1
Culture fatte accrescere per 24 h in pozzetto		4	4	2
Cellule di controllo (culture di 6 h)		4	4	2
<b>Trattamento fisico</b>				
30 min/65°C		1	2	1
15 min/120°C		1	1	1
<b>Trattamento enzimatico</b>				
Tampone A		4	3	2
5,0 mg/ml tripsina		1	2	1
5,0 mg/ml proteinasi		1	2	1
5,0 mg/ml chimotripsina		1	2	1
Tampone B		4	3	2
5,0 mg/ml pepsina		2	3	1
<b>Trattamento chimico</b>				
Tampone C		4	3	2
0,05 M periodato di sodio		4	3	2
0,05 M iodato di sodio		4	3	2
5M LiCl		2	2	1

<sup>a</sup>Classe di Adesione (AC):1, OD≤0,5; 2, 0,5<OD≤1,2; 3, 1,2<OD≤2,0; 4, OD>2

### Adesione al pericarpio delle olive

La Figura 4 mostra l'ancoraggio e la distribuzione del ceppo *L. paracasei* IMPC 2.1 sul pericarpio (cfr. anche tabelle 1 e 2).

### Persistenza del ceppo *L. paracasei* IMPC 2.1 nel tratto gastro-intestinale

Due individui adulti sani sono stati alimentati per 7 giorni con porzioni di 5 (soggetto 1) e 10 (soggetto 2) olive, accuratamente sgocciolate, contenenti rispettivamente  $3 \times 10^{10}$  e  $6 \times 10^{10}$  UFC totali del ceppo *L. paracasei* IMPC 2.1. La composizione della flora batterica intestinale dei due soggetti è stata monitorata all'inizio dell'assunzione del prodotto ( $t=0$ ), dopo 7 giorni ( $t=7$ ) di somministrazione quotidiana delle porzioni e dopo 3 giorni dalla sospensione della somministrazione. Per ciascun prelievo, 1 grammo di feci di ciascun soggetto è stato addizionato di 9 ml di liquido di Ames, omogeneizzato e sottoposto a diluizioni decimali che sono state piastrate su substrato Rogosa  $\pm$  vancomicina 12  $\mu\text{g/ml}$  e fatte accrescere in anaerobiosi per 48 h a 37°C.

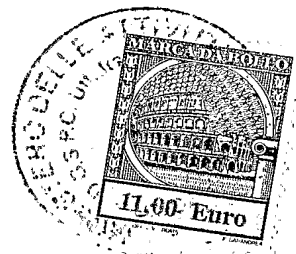
**Tabella 4. Popolazioni lattiche presenti nei soggetti umani prima e dopo l'assunzione di olive da mensa addizionate di *L. paracasei* IMPC 2.1.**

	UFC totali su Rogosa + vancomicina		
	$t = 0$	$t = 7$ giorni	$t = 3$ giorni dopo sospensione
Soggetto 1 alimentato con $3 \times 10^{10}$ UFC/die	$2,7 \times 10^7$	$2 \times 10^9$	$4,5 \times 10^6$
Soggetto 2 alimentato con $6 \times 10^{10}$ UFC/die	$7,0 \times 10^4$	$3,1 \times 10^6$	$5,2 \times 10^5$

Nei due soggetti è stato osservato in media (Tabella 4) un incremento della popolazione lattica intestinale di circa due cicli logaritmici; un'attesa

riduzione della popolazione di circa 2,5 cicli nel soggetto 1 e di circa 1 ciclo nel soggetto 2 è stata registrata a seguito della sospensione del trattamento.

Le colonie isolate nel corso dell'esperimento sono state sottoposte a identificazione molecolare (vedi paragrafo selezione del ceppo) che ha permesso di accertare che il ceppo 2.1 è presente nei due soggetti dopo le prove di somministrazione e che esso colonizza l'intestino dei soggetti.



### RIVENDICAZIONI

1. Olive da mensa caratterizzate dal fatto che contengono, adesi sul pericarpo, lattobacilli e/o bifidobatteri.
2. Olive secondo la rivendicazione 1 caratterizzate dal fatto che i lattobacilli sono scelti fra *Lactobacillus rhamnosus* e *L. paracasei* e i bifidobatteri sono scelti fra *Bifidobacterium bifidum* e *B. longum*.
3. Olive da mensa secondo la rivendicazione 2 caratterizzate dal fatto che i lattobacilli sono scelti fra: *Lactobacillus rhamnosus* GG ATCC53103; *L. rhamnosus* IMPC11; *L. rhamnosus* IMPC19; *Lactobacillus paracasei* LMG P-22043; *Lactobacillus paracasei* IMPC 4.1 e che i bifidobatteri sono scelti fra *Bifidobacterium bifidum* ATCC15696 e *Bifidobacterium longum* ATCC15708.
4. Olive da mensa secondo la rivendicazione 3 caratterizzate dal fatto che i lattobacilli appartengono al ceppo *Lactobacillus paracasei* LMG P-22043.
5. Alimenti probiotici a base di olive da mensa di una qualsiasi delle rivendicazioni 1-4.
6. Uso di lattobacilli e di bifidobatteri per rivestire il pericarpo di olive da mensa.
7. *Lactobacillus paracasei* LMG P-22043.

Milano, 5 dicembre 2003

Il Mandatario  
(Bianchetti Giuseppe)  
di Bianchetti Bracco Minoja S.r.l.

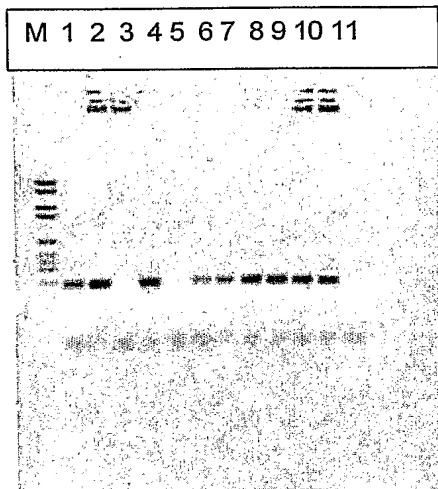
*G. Bianchetti*



Fig. 1.

MI 2003 A 0 0 2 3 9 1

PCR Y2/PARA per la identificazione del ceppo 2.1 (*L. paracasei*)



- | M   | Marker VI |
|-----|-----------|
| 1.  | 2.1       |
| 2.  | CV1       |
| 3.  | 4.1       |
| 4.  | 1.3       |
| 5.  | 1.5       |
| 6.  | Sal       |
| 7.  | 1.4       |
| 8.  | Acti      |
| 9.  | B21060    |
| 10. | CLV1      |
| 11. | B21070    |

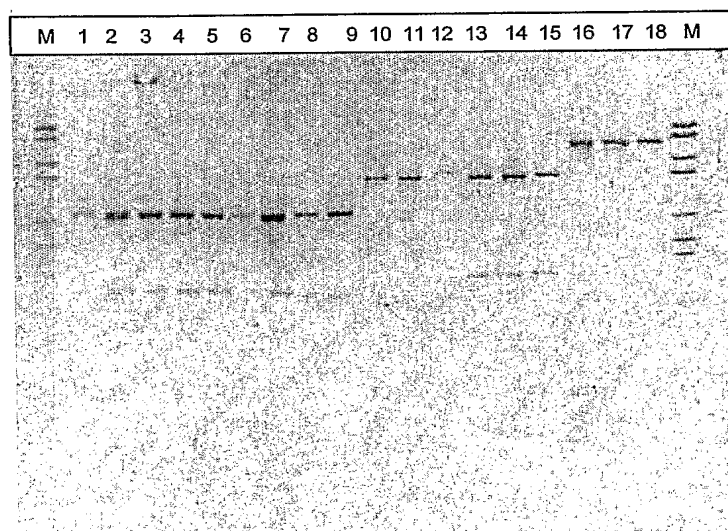
Il Mandatario  
(Bianchetti Giuseppe)  
di Bianchetti Bracco Minoja S.r.l.

*G. Bianchetti*



**Fig. 2.**

**Conferma dell'identificazione del ceppo *L. paracasei* IMPC 2.1 mediante tecnica ARDRA**

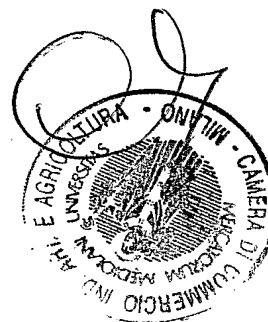


M	Marker VI
1.	2.1
2.	CV1
3.	4.1
4.	1.3
5.	1.5
6.	Sal
7.	1.4
8.	Acti
9.	CLV1

**MI 2003 A 0 0 2 3 9 1**

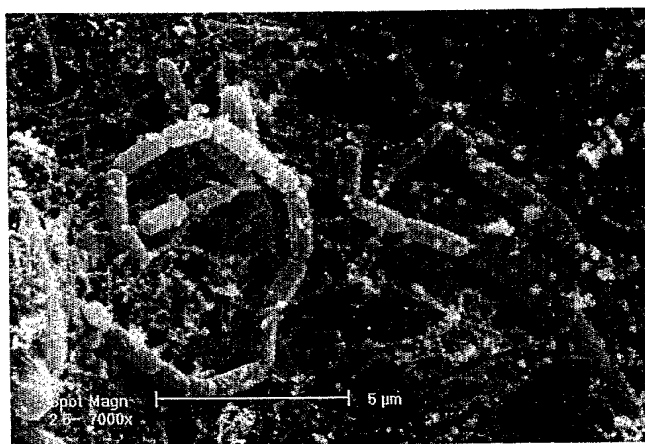
Il Mandatario  
(Bianchetti Giuseppe)  
di Bianchetti Bracco Minoja S.r.l.

*G. Bianchetti*



**Fig. 3.**

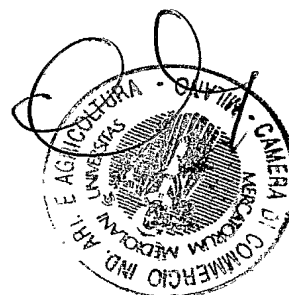
**Adesione del ceppo *L. paracasei* IMPC 2.1 al muco intestinale di maiale  
(osservazione al SEM).**



**MI 2003 A 0 0 2 3 9 1**

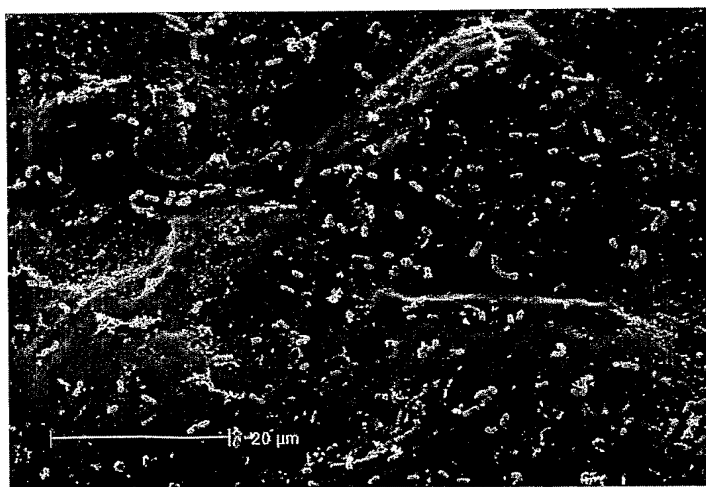
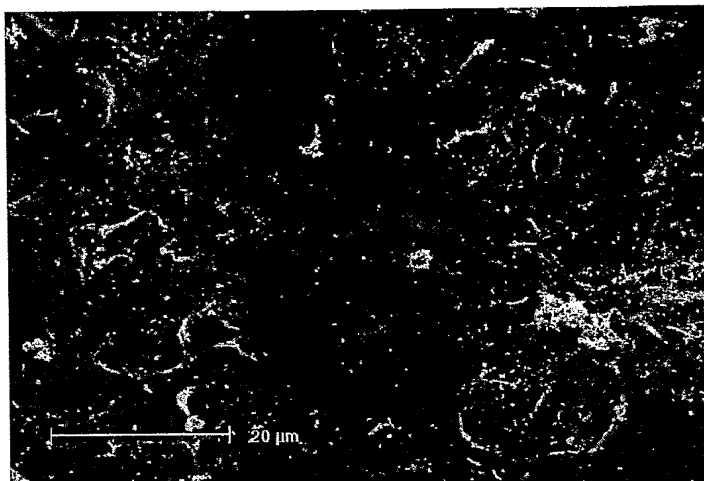
**Il Mandatario  
(Bianchetti Giuseppe)  
di Bianchetti Bracco Minoja S.r.l.**

*G. Bianchetti*



**Fig. 4.**

**Adesione del ceppo *L. paracasei* IMPC 2.1 sul pericarpo dell'oliva (sotto);  
sopra, pericarpo di oliva di controllo (osservazione al SEM).**



MI 2003 A 0 0 2 3 9 1

Il Mandatario  
(Bianchetti Giuseppe)  
di Bianchetti Bracco Minoja S.r.l.

*G. Bianchetti*

